

Rec'd PCT/PTO 14 MAR 2005

10/019543

PCT/JP 01/04158

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

14.06.01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2000年 5月19日

REC'D 03 AUG 2001

WIPO PCT

出願番号
Application Number:

特願2000-148726

出願人
Applicant(s):

鐘淵化学工業株式会社

BEST AVAILABLE COPY

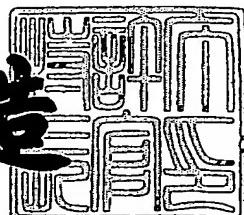
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 7月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3063285

【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4186

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 7/00

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区塩屋町 6-31-17 三青荘

【氏名】 横溝 聰

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県明石市朝霧町 3-123 セゾン朝霧 304

【氏名】 福地 健

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県西宮市大森町 11-33

【氏名】 松本 圭司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都府中市栄町 1-31-10

【氏名】 高木 正道

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県大宮市プラザ 57-2

【氏名】 太田 明徳

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田正利

【代理人】

【識別番号】 100086586

【弁理士】

【氏名又は名称】 安富 康男

【選任した代理人】

【識別番号】 100104813

【弁理士】

【氏名又は名称】 古谷 信也

【選任した代理人】

【識別番号】 100108431

【弁理士】

【氏名又は名称】 村上 加奈子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033891

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705256

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

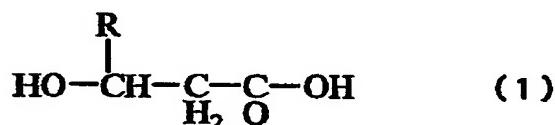
【発明の名称】 形質転換体及びそれを用いたポリエステルの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵母に、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現カセットが一種以上導入されてなることを特徴とする形質転換体。

【請求項2】 ポリエステルは、下記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合体である請求項1記載の形質転換体。

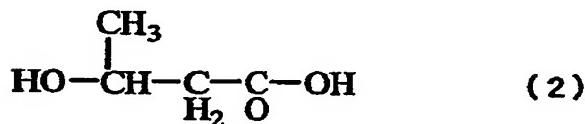
【化1】



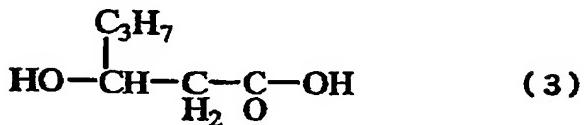
式中、Rは、アルキル基を表す。

【請求項3】 ポリエステルは、下記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)である請求項2記載の形質転換体。

【化2】



【化3】



【請求項4】 酵母がAciculociconidium属、Ambrosiozyma属、Arthroascus属、Arxiozyma属、Ashbya属、Babjevia属、Bensingtonia属、Botryoascus属、Botryozyma属、Brettanomyces属、Bullera属、Bulleromyces属、Candida属、Citeromyces属、Clavispora属、Cryptococcus属、Cystofil

*obasidium*屬、*Debaryomyces*屬、*Dekkera*屬、*Dipodascopsis*屬、*Dipodascus*屬、*Eenielia*屬、*Endomycopsisella*屬、*Eremascus*屬、*Eremothecium*屬、*Erythrobasidium*屬、*Fellomyces*屬、*Filobasidium*屬、*Galactomyces*屬、*Geotrichum*屬、*Guilliermondella*屬、*Hanseniaspora*屬、*Hansenula*屬、*Hasegawaea*屬、*Holtermannia*屬、*Hormoascus*屬、*Hyphopichia*屬、*Issatchenkia*屬、*Kloeckera*屬、*Kloeckeraspora*屬、*Kluyveromyces*屬、*Kondoa*屬、*Kuraishia*屬、*Kurtzmanomyces*屬、*Leucosporidium*屬、*Lipomyces*屬、*Loddерomyces*屬、*Malassezia*屬、*Metschnikowia*屬、*Mrakia*屬、*Myxozyma*屬、*Nadsonia*屬、*Nakazawaiae*屬、*Nematospora*屬、*Ogataea*屬、*Oospodium*屬、*Pachysolen*屬、*Pachytichospora*屬、*Phaffia*屬、*Pichia*屬、*Rhodosporidium*屬、*Rhodotorula*屬、*Saccharomyces*屬、*Saccharomycodes*屬、*Saccharomycopsis*屬、*Saitoella*屬、*Sakaguchia*屬、*Saturnospora*屬、*Schizoblastosporion*屬、*Schizosaccharomyces*屬、*Schwan niomyces*屬、*Sporidiobolus*屬、*Sporobolomyces*屬、*Sporopachydermia*屬、*Stephanoascus*屬、*Sterigmatomyces*屬、*Sterigmatosporidium*屬、*Symbiotaphrina*屬、*Sympodiomyces*屬、*Sympodiomycopsis*屬、*Torulaspora*屬、*Trichosporiella*屬、*Trichosporon*屬、*Trigonopsis*屬、*Tsuchiyaea*屬、*Udeniomyces*屬、*Waltomyces*屬、*Wickerhamia*屬、*Wickerhamiella*屬、*Williopsis*屬、*Yamadazyma*屬、*Yarrowia*屬、*Zygoa*s

*Cus*属、*Zygosaccharomyces*属、*Zygowilliopsis*属又は*Zygozyma*属である請求項1～3のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項5】 酵母が*Yarrowia lipolytica*である請求項1～4のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項6】 ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現力セットが、酵母で機能するプロモーター、ターミネーターからなる請求項1～5のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項7】 プロモーター、ターミネーターが*Yarrowia lipolytica*由来である請求項6項に記載の形質転換体。

【請求項8】 プロモーターが*Yarrowia lipolytica*のALK3由来である請求項6又は7記載の形質転換体。

【請求項9】 ターミネーターが*Yarrowia lipolytica*のXPR2由来である請求項6～8のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項10】 ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子が、アエロモナス・キヤビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子である請求項1～9のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項11】 ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子が、アエロモナス・キヤビエのPHA合成酵素遺伝子、または、PHA合成酵素遺伝子および(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子である請求項1～10のいずれか1項に記載の形質転換体。

【請求項12】 請求項1～11記載のいずれか1項に記載の形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、前記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、共重合ポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、自然環境(土中、河川、海中)

の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子を発酵合成する能力が改善された形質転換体、及び、その形質転換体を利用した共重合ポリエスチルの製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例としては3-ヒドロキシ酪酸（以下3HBと略す）のホモポリマーであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下、P(3HB)と略す）であり、1925年に*Bacillus megaterium*で最初に発見された。P(3HB)は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしいグリーンプラスチックとして注目されてきた。しかし、P(3HB)は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲が限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

【0003】

その中で、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報などに3-ヒドロキシ酪酸(3HB)と3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)とからなる共重合体（以下P(3HB-co-3HV)と略す）の製造方法が開示されている。このP(3HB-co-3HV)はP(3HB)に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。しかしながら、実際のところP(3HB-co-3HV)は3HVモル分率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される柔軟性が向上しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取っ手など硬質成形体の分野にしか利用されなかった。

【0004】

近年、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸（以下、3HHと略す）との2成分共重合ポリエステル（以下P(3HB-co-3HH)と略す）およびその製造方法について研究がなされた。たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP(3H

B-co-3HH) の製造方法は、土壤より単離されたアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) を用いてオレイン酸等の脂肪酸やオリーブオイル等の油脂から発酵生産するものであった。また、P(3HB-co-3HH) の性質に関する研究もなされている (Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823 (1995))。この報告では炭素数が12個以上の脂肪酸を唯一の炭素源として *A. caviae* を培養し、3HHが11~19mol%のP(3HB-co-3HH) を発酵生産している。このP(3HB-co-3HH) は3HHモル分率の増加にしたがって、P(3HB) の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P(3HB-co-3HV) を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。しかしながら、本製造方法では菌体生産量4g/L、ポリマー含量30%でありポリマー生産性が低いことから、実用化に向け更に高い生産性が得られる方法が探索された。

【0005】

P(3HB-co-3HH) を生産する *A. caviae* より PHA シンターゼ遺伝子がクローニングされた (T. Fukui, Y. Doi, J. Bacteriol., vol. 179, No. 15, 4821-4830 (1997)、特開平10-108682号公報)。本遺伝子を *Ralstonia eutropha* (旧 *Alcaligenes eutrophus*) に導入した形質転換株を用いてP(3HB-co-3HH) の生産を行った結果、菌体生産性は4g/L、ポリマー含量は30%であった。更に本形質転換株を炭素源として植物油脂を用いて培養した結果、菌体含量4g/L、ポリマー含量80%が達成された (T. Fukui等 Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 333 (1998))。

【0006】

本ポリマーP(3HB-co-3HH) は3HHモル分率を変えることで、硬質ポリマーから軟質ポリマーまで幅広い物性を持つため、テレビの筐体などのように硬さを要求されるものから糸やフィルムなどの柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できる。しかしながら、これらの製造方法では

本ポリマーの生産性が依然として低く、本ポリマーの実用化に向けた生産方法としては未だ不十分といわざるを得ない。

【0007】

最近になって、3HBの前駆物質であるacetyl-CoAを効率よく生産すると考えられる酵母を生産菌とした生分解性ポリエステルの生産研究がLeafらによって行われた (Microbiology, vol. 142, pp 1169-1180 (1996))。酵母の一種であるSaccharomyces cerevisiaeにR. eutrophphaのポリエステル重合酵素遺伝子を導入して形質転換体を作製し、グルコースを炭素源として培養することによってP(3HB)の蓄積(ポリマー含量0.5%)を確認している。しかし、本研究で生産されるポリマーは硬くて脆い性質を有するP(3HB)であった。

【0008】

酵母は増殖が早く菌体生産性が高いことで知られている。また、ポリマーの前駆物質であるacetyl-CoAを効率よく生産すると考えられることから高いポリマー生産性が期待される。さらに、細菌と比べて菌体と培養液との分離が容易であることから、ポリマーの抽出精製工程をより簡単にすることも可能である。そこで、優れた物性を有するP(3HB-co-3HH)を酵母を用いて生産する方法が求められていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記現状に鑑み、ポリエステル合成に関与する遺伝子発現力セットを酵母に導入して形質転換した形質転換体、及び、得られた形質転換体を培養することにより、生分解性かつ優れた物性を有するP(3HB-co-3HH)等のポリエステルを酵母を宿主として製造する方法を提供するものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

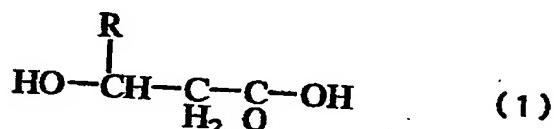
本発明は、酵母に、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現力セットが一種以上導入されてなる形質転換体である。

【0011】

本発明者らは様々な検討を行った結果、下記一般式(1)に示す3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関する酵素遺伝子の一種以上のそれぞれに、酵母で実質的に機能するプロモーター、ターミネーターを連結することにより遺伝子発現力セットを作製し、さらに本遺伝子発現力セットを酵母に導入して形質転換株を作製し、本形質転換株を培養することにより、その培養物から下記一般式(1)に示す3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造することに成功した。

【0012】

【化4】



【0013】

式中、Rは、アルキル基を表す。

すなわち、本発明はまた、上記形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、上記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取するポリエステルの製造方法である。

ここで、「実質的」とは遺伝子発現力セットの構築に必要なプロモーター、ターミネーター等の遺伝子配列は、発現に必要な機能を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じてもよいものとする。

以下に、本発明の詳細を説明する。

【0014】

【発明の実施の形態】

(1) 宿主

使用する酵母には特に制限はなく、菌株の寄託機関（例えばIFO、ATCC等）に寄託されているAciculociconidium属、Ambrosiozyma属、Arthroascus属、Arxiozyma属、Ashbya属、Babjevia属、Bensingtonia属、Botryoascus属、Botryozyma属、Brettanomyces属、Bullera属

、*Bulleromyces*属、*Candida*属、*Citeromyces*属
、*Clavispora*属、*Cryptococcus*属、*Cystofilobasidium*属、*Debaryomyces*属、*Dekkera*属、*Dipodascopsis*属、*Dipodascus*属、*Eeniella*属、*Endomycopsisella*属、*Eremascus*属、*Eremothecium*属、*Erythrobasidium*属、*Fellowmyces*属、*Filobasidium*属、*Galactomyces*属、*Geotrichum*属、*Guilliermondella*属、*Hanseniaspora*属、*Hansenula*属、*Hasegawaea*属、*Holtermannia*属、*Hormoascus*属、*Hyphopichia*属、*Issatchenkia*属、*Kloeckera*属、*Kloeckeraspora*属、*Kluyveromyces*属、*Kondoa*属、*Kuraishia*属、*Kurtzmanomyces*属、*Leucosporidium*属、*Lipomyces*属、*Loderomyces*属、*Malassezia*属、*Metschnikowia*属、*Mrakia*属、*Myxozyma*属、*Nadsonia*属、*Nakazawaiae*属、*Nematospora*属、*Ogataea*属、*Oospodium*属、*Pachysolen*属、*Pachytichospora*属、*Phaffia*属、*Pichia*属、*Rhodosporidium*属、*Rhotorula*属、*Saccharomyces*属、*Saccharomycodes*属、*Saccharomycopsis*属、*Saitoella*属、*Sakaguchia*属、*Saturnospora*属、*Schizoblastosporion*属、*Schizosaccharomyces*属、*Schwanniomyces*属、*Sporidiobolus*属、*Sporobolomyces*属、*Sporopachydermia*属、*Stephanoascus*属、*Sterigmatomyces*属、*Sterigmatosporidium*属、*Symbiotaphrina*属、*Sympodiomyces*属、*Sympodiomycopsis*属、*Torulaspora*属、*Trichosporiella*属、*Trichosporon*属、*Trigonopsis*属、*Tsuchiyaea*属、*Udeniomyces*属、*Waltomyces*

属、*Wickerhamia*属、*Wickerhamiella*属、*Williopsis*属、*Yamadazyma*属、*Yarrowia*属、*Zygoascus*属、*Zygosaccharomyces*属、*Zygowilliopsis*属、*Zygozyma*属などの酵母を使用することができる。

また、本発明の形質転換体において用いられる酵母は、*Yarrowia lipolytica*であることが好ましい。

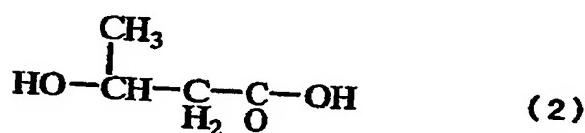
[0015]

(2) ポリエステル合成に関与する遺伝子

ポリエステル合成に関与する遺伝子としては特に限定されないが、上記一般式（1）で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に關する遺伝子が好ましく、下記式（2）で示される3-ヒドロキシ酇酸と下記式（3）で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP（3HB-co-3HH）の合成に關する遺伝子であることがより好ましい。

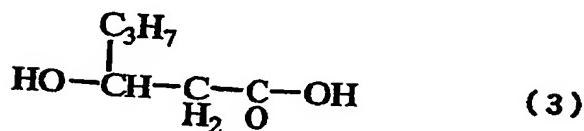
[0016]

[115]



[0017]

【化6】



[0018]

上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する遺伝子としては特に限定されず、例えば特開平10-108682号公報に記載されているポリエステル重合酵素遺伝子断片を用いることができる。上記ポリエステル重合酵素遺伝子としては、例えば、PHA合成酵

素遺伝子が挙げられる。また、本ポリエステル重合酵素遺伝子と共にポリエステル合成に関与する遺伝子を導入しても良い。これらの遺伝子としては、たとえば、 β 酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))や、アセチルCoAを二量化してモノマーである3-ヒドロキシブチリルCoAを合成する β ケトチオラーゼ、NADH依存性ヒドラターゼ遺伝子(Peoples OP, et al J. Biol. Chem. 264 (26) 15298-15303 (1989))などが挙げられる。

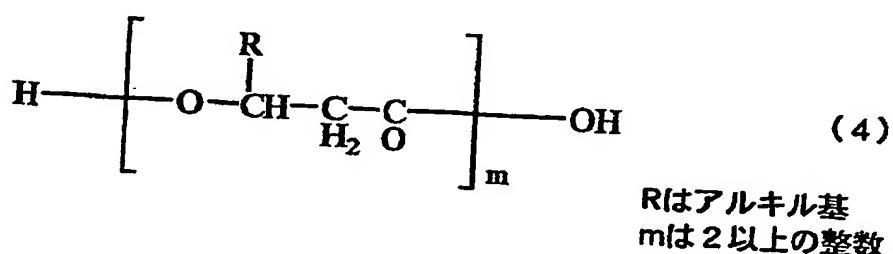
これらの遺伝子は実質的な酵素活性を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じていてもよいものとする。

【0019】

また、上記PHA合成酵素によって合成されるポリエステルは、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるものであり、下記一般式(4)に示される。より好ましい態様においては、上記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)であり、下記一般式(5)に示される。

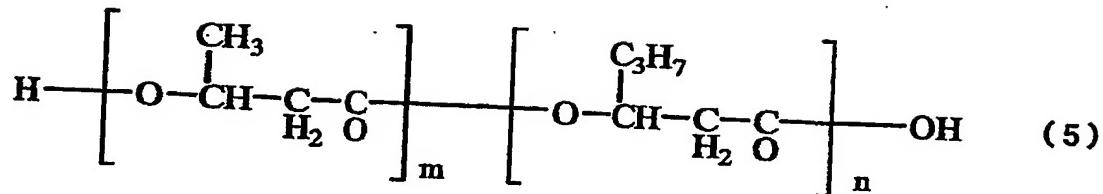
【0020】

【化7】



【0021】

【化8】



m, nは1以上の整数

【0022】

(3) 遺伝子発現カセットの構築

酵母における遺伝子発現のためには、当該遺伝子の5'上流にプロモーター、UAS等のDNA配列の連結、当該遺伝子の3'下流にポリA付加シグナル、ターミネーター等のDNA配列の連結が必要である。これらのDNA配列は宿主として使用する酵母で機能する配列であればどのような配列でも利用できる。プロモーターには構成的に発現を行うものや誘導的に発現を行うものがあるが、いずれのプロモーターも用いててもよい。

【0023】

また、本発明の形質転換体においては、上記プロモーター、ターミネーターが、Yarrowia lipolyticaで機能するものであることが好ましく、上記プロモーター、ターミネーターがYarrowia lipolytica由来であることが好ましい。より好ましくは、Yarrowia lipolyticaのALK3由来のプロモーター、XRP2由来のターミネーターを利用する。

【0024】

本発明の形質転換体に用いられる遺伝子発現カセットは一例として、次のように構築することができる。

構築に用いられるベクターは、大腸菌において自立増殖するプラスミドであればどのようなベクターでもよく、更に酵母において自立増殖可能な領域を合わせ持っていてもよい。酵母において自立増殖できるベクターは、菌体内に保持される。また、遺伝子発現カセットを染色体上に組み込むこともできる。一例としてYarrowia lipolyticaにおいて自立増殖可能なpSAT4やp

SUT5を用いることができる（1997年度 東京大学大学院、博士論文「酵母*Yarrowia lipolytica*のn-アルカン誘導型チトクロームP450遺伝子群に関する研究」飯田敏也）。

【0025】

本発明の形質転換体においては、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子であることが好ましく、例えば、*A. caviae* 由来のPHA合成酵素遺伝子（以下phaCと略す）（配列番号1）、または、phaCおよびβ酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子（以下phaJと略す）（T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999)）（配列番号2）が好適に用いられる。

これらの構造遺伝子のそれぞれ5'上流に*Y. lipolytica*のALK3遺伝子のプロモーターALK3p（配列番号3）（GenBank AB010390）を連結することができる。

【0026】

プロモーターと構造遺伝子とを連結するための制限酵素部位を作製するためには、PCR法が利用できる。PCRに用いたプライマー配列を配列番号4から配列番号10に示す。PCRの条件は目的遺伝子断片が増幅できればどのような条件を用いてもよい。

【0027】

プロモーター部分は配列番号3を鋳型にして配列番号4と配列番号5、配列番号5と配列番号6を用いて、それぞれ5'末端がXbaI、3'末端がNdeIのALK3Xと5'末端がSacII、3'末端がNdeIのALK3Sを作製することができる。phaCは配列番号1を鋳型にして配列番号7と配列番号8とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がPstIである約100bpの断片を作製することができる。これに残りのPstI-BamHI約1700bpを結合して、5'末端がNdeI、3'末端がBamHIである完全長のphaC

を作製することができる。p_{haJ}は配列番号2を鋳型にして配列番号9と配列番号10とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がKpnIであるp_{haJ}を作製することができる。ベクターにはプラスミドpSUT5(図1、配列番号11)とpSUT5のNdeIサイトを配列番号12のリンカーDNAを用いて、XbaIサイトに変更したベクターpSUT6とを使用することができる。pSUT6のマルチクローニングサイトのSacII、KpnIサイトにALK3Sとp_{haJ}とを結合し、プラスミドpSUT-p_{haJ}(図2)を構築することができる。次にpSUT5のマルチクローニングサイトのXbaI、BamH IサイトにALK3Xとp_{haC}とを結合し、プラスミドpSUT-PHA1(図3)を構築することができる。

【0028】

さらにプラスミドpSUT-p_{haJ}からSacIIとXbaIとを用いて、ALK3Sとp_{haJ}と下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、プラスミドpSUT-PHA1のSacII、XbaIサイトに結合したプラスミドpSUT-PHA2(図4)の二種類の組換え用プラスミドを構築することができる。以上 の方法により、酵母Yarrowia lipolyticaにおいて上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現力セットを構築することができる。

【0029】

(4) 形質転換体の作製

酵母にポリマー合成に関与する遺伝子発現力セット組換えベクターを導入するためには、公知の方法により行うことができる。例えば、カルシウム法(Lederberg, E. M. et al., J. Bacteriol. 119. 1072 (1974))やエレクトロポレーション法(Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1. 8. 4頁、1994年)等を用いることができる。また、Fast TrackTM-Yeast Transformation Kit_{SM}(Geno Technology)のような市販の形質転換キットを利用することもできる。

一例として宿主として、Y. lipolytica CXAU1株(T. Iida

a, et al Yeast, 14, 1387-1397 (1998) を用いることができる。本菌株に上記の形質転換法を用いてポリマー合成に関与する遺伝子発現カセットを形質転換し、pSUT-PHA1を有するY. lipolytica PHA1株と、pSUT-PHA2を有するY. lipolytica PHA2株を作製することができる。

【0030】

(5) ポリエステルの製造

本発明のポリエステルの製造方法では、本発明の形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取する。

本発明の形質転換体を培養することによるポリエステルの製造は、次のようにして行うことができる。培養に用いる炭素源としては、酵母が資化できるものであればどのようなものでもよい。また、プロモーターの発現が誘導型である場合には、適時誘導物質を添加すればよい。誘導物質が主要炭素源である場合もある。炭素源以外の栄養源としては窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の生育可能な温度であればよいが、20℃から40℃好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた該培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すればよい。

【0031】

炭素源としてはグルコース、グリセリン、シュークロース等の炭水化物や油脂類や脂肪酸類さらにはn-パラフィン等を用いることができる。油脂としては、例えばナタネ油、ヤシ油、バーム油、バーム核油などが挙げられる。脂肪酸としてはヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和・不飽和脂肪酸、又は、これら脂肪酸のエステルや塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。一例としてYarrowia lipolyticaの培養において、炭素源として油脂を用いて培養することもできる。また、油脂を資化ができないかまたは効率よく資化できない酵母では、培地中にリパーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リパーゼ遺伝子を形質転換することにより、油脂資化能を付与することもできる。

【0032】

また、炭素源として奇数の炭素鎖を有する脂肪酸やn-パラフィン等を用いた場合、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの炭素鎖に奇数成分の割合を高めることができる。

【0033】

窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

【0034】

その他の有機栄養源としてはアミノ酸類、例えばグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなどや、ビタミン類、例えばビタミンB₁、ビタミンB₁₂、ビオチン、ニコチニン酸アミド、パントテン酸、ビタミンC等が挙げられる。

【0035】

本発明において、ポリエステルの菌体からの回収は例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器などで菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体をクロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液を濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。沈殿したポリエステルを濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収することができる。

得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行う。

【0036】

本発明のポリエステルの製造方法は、上述のような構成からなるので、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを生産性よく製造することができる。

また、上述したプラスミド pSUT-PHA1、pSUT-PHA2を有するY. lipolytica組み換え株を作製し、培養する方法により、上記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)を製造することができる。

【0037】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

【0038】

(実施例1)

組換えプラスミドおよび組換え株の構築

ポリエステル合成に関する遺伝子として、*A. caviae*由来の重合酵素遺伝子（以下phaCと略す）（配列番号1）と、β酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子（以下phaJと略す）（T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999)）（配列番号2）を使用した。これらの遺伝子がY. lipolyticaで発現するように、それぞれの5'上流にY. lipolyticaのALK3遺伝子のプロモーターALK3p（配列番号3）（GenBank AB010390）を連結することにした。プロモーターと構造遺伝子とを連結するための制限酵素部位を作製するためには、PCR法を利用した。PCRに用いたプライマー配列を配列番号4から配列番号10に示す。PCRの条件は94°C 1分、55°C 2分、72°C 3分を1サイクルとし、これを25回繰り返して、目的遺伝子断片を増幅した。ポリメラーゼは宝酒造（株）のExTaqを使用した。プロモーター部分は配列番号3を鑄型にして配列番号4と配列番号5、配列番号5と配列番号6を用いて、それぞれ5'末端がXbaI、3'末端がNdeIのALK3Xと5'末端がSacII、3'末端がNdeIのALK3Sとを作製した。

【0039】

p h a Cは配列番号1を鋳型にして配列番号7と配列番号8とを用いて、5'末端がN d e I、3'末端がP s t Iである約100 b pの断片を作製した。これに残りのP s t I-B a m H I断片約1700 b pを結合して、5'末端がN d e I、3'末端がB a m H Iである完全長のp h a Cを作製した。p h a Jは配列番号2を鋳型にして配列番号9と配列番号10とを用いて、5'末端がN d e I、3'末端がK p n Iであるp h a Jを作製した。

【0040】

ベクターにはプラスミドp SUT 5（図1、配列番号11）とp SUT 5のN d e Iサイトを配列番号12のリンカーDNAを用いて、X b a Iサイトに変更したベクターp SUT 6とを使用した。p SUT 6のマルチクローニングサイトのS a c I I I、K p n IサイトにALK3 Sとp h a J jとを結合し、プラスミドp SUT-p h a J（図2）を構築した。次にp SUT 5のマルチクローニングサイトのX b a I、B a m H IサイトにALK3 Xとp h a Cとを結合し、プラスミドp SUT-P H A 1（図3）を構築することができる。さらにプラスミドp SUT-p h a JからS a c I I IとX b a Iとを用いて、ALK3 Sとp h a Jと下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、プラスミドp SUT-P H A 1のS a c I I I、X b a Iサイトに結合したプラスミドp SUT-P H A 2（図4）の二種類の組換え用プラスミドを構築した。以上の方法により、酵母Y a r r o w i a l i p o l y t i c aにおいて上記一般式（1）で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築した。

【0041】

宿主にはY. l i p o l y t i c a CXAU1株（T. I i d a, et al Yeast, 14, 1387-1397 (1998)）を使用した。宿主に構築したプラスミドを導入するために、Fast TrackTM-Yeast Transformation Kit_{SM} (Geno Technology) を使用した。プロトコルにしたがって操作し、選択プレート (0.67 w/v% Yeast Nitrogen base without amino acid

、2 w/v%グルコース、24 mg/Lアデニン塩酸塩、2 w/v%寒天) を使用して組換え株を取得した。

【0042】

(実施例2)

P(3HB-co-3HH)の生産

プラスミド pSUT5、pSUT-PHA1、pSUT-PHA2を有するY. lipolytica組換え株を次のように培養した。前培地はYPD培地(1 w/v% Yeast-extract、2 w/v% Bacto-Peptone、2 w/v%グルコース)を使用した。ポリエステル生産培地には1/4YP培地(0.25 w/v% Yeast-extract、0.5 w/v% Bacto-Peptone)とミネラル培地(0.7 w/v% KH₂PO₄、1.3 w/v% (NH₄)₂HPO₄、0.5 w/v% プロエキスAP-12(播州調味料)、0.04 w/v%アデニン、1 ppmチアミン塩酸塩、1 v/v%微量金属塩溶液(0.1N塩酸に8 w/v% MgSO₄·7H₂O、0.6 w/v% ZnSO₄·7H₂O、0.9 w/v% FeSO₄·7H₂O、0.05 w/v% CuSO₄·5H₂O、0.1 w/v% MnSO₄·6-7H₂O、1 w/v% NaCl)にパーム油を2 w/v%を添加したもの)を使用した。

【0043】

各組換え株のグリセロールストック100 μlを100 mlの前培地が入った500 ml坂口フラスコに接種して20時間培養し、500 mLの生産培地を入れた2 L坂口フラスコに1 v/v%接種した。これを培養温度30°C、振盪速度120 rpm、培養時間はYPD培地は24時間、ミネラル培地は72時間という条件で培養した。培養液をオートクレーブ後、遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄した後、凍結乾燥して乾燥菌体重量を測定した。

【0044】

得られた乾燥菌体を粉碎し、クロロホルムを100 ml添加し一晩攪拌して抽出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで1-2 mlにまで濃縮し、濃縮液に10 mlのヘキサンを添加して、ヘキサン不溶物を析出させた。

【0045】

得られたヘキサン不溶物約2mgに500μlの硫酸一メタノール混液(15:85)と500μlのクロロホルムとを添加して密栓し、100℃で140分間加熱することでポリエステル分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに0.3gの炭酸水素ナトリウムを添加し、中和した。これに1mlのジイソプロピルエーテルを添加して攪拌機を用いて攪拌した。遠心分離して有機溶媒層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所GC-17A、キャピラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1(カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4μm)を用いた。温度条件は、初発温度100℃から8℃/分の速度で昇温した。得られた分析結果を表1に、またその時のサンプル(3)のチャートを図6に示す。また、得られたヘキサン不溶物のNMR分析(JEOL、JNM-EX400)、IR分析(島津製作所、DR-800)も行った。その一例としてサンプル(6)の結果を図7、図8に示す。

【0046】

【表1】

培養および分析結果

サンプル	培地	菌株	菌体量 (g/L)	ポリマー蓄積量 (wt%)	3HH分率 (mol%)
(1)	1/4YP培地コントロール		3.56	8.9×10^{-2}	
(2)		PHA1株	3.65	1.9×10^{-1}	
(3)		PHA2株	3.43	2.6×10^{-1}	15(GC測定)
(4)	ミネラル培地	コントロール	0.15	6.7×10^{-2}	
(5)		PHA1株	0.19	1.4×10^{-1}	
(6)		PHA2株	0.17	1.8	27(NMR測定)

【0047】

この結果から、酵母を用いて作製した形質転換体から共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)が生産できることがわかった。また、酵母にもごく僅かながらポリマーが存在することがわかった。

【0048】

【発明の効果】

本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する上記一般式(1)で示される3

—ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合体を、酵母を用いて生産することが可能となった。

【0049】

【配列表】

<110> 鐘淵化学工業株式会社 KANAKA CORPORATION

<120> 形質転換体及びそれを用いたポリエステルの製造方法

<130> TKS-4186

<160> 12

<210> 1

<211> 1785

<212> DNA

<213> Aeromonas caviae

<220>

<221> CDS

<222> 1..1782

<400> 1

atg	agc	caa	cca	tct	tat	ggc	ccg	ctg	ttc	gag	gcc	ctg	gcc	cac	tac	48
aat	gac	aag	ctg	ctg	gcc	atg	gcc	aag	gcc	cag	aca	gag	cgc	acc	gcc	96
cag	gcg	ctg	ctg	cag	acc	aat	ctg	gac	gat	ctg	ggc	cag	gtg	ctg	gag	144
cag	ggc	agc	cag	caa	ccc	tgg	cag	ctg	atc	cag	gcc	cag	atg	aac	tgg	192
tgg	cag	gat	cag	ctc	aag	ctg	atg	cag	cac	acc	ctg	ctc	aaa	agc	gca	240
ggc	cag	ccg	agc	gag	ccg	gtg	atc	acc	ccg	gag	cgc	agc	gat	cgc	cgc	288
ttc	aag	gcc	gag	gcc	tgg	agc	gaa	caa	ccc	atc	tat	gac	tac	ctc	aag	336

cag tcc tac ctg ctc acc gcc agg cac ctg ctg gcc tcg gtg gat gcc	384
ctg gag ggc gtc ccc cag aag agc cgg gag cgg ctg cgt ttc ttc acc	432
cgc cag tac gtc aac gcc atg gcc ccc agc aac ttc ctg gcc acc aac	480
ccc gag ctg ctc aag ctg acc ctg gag tcc gac ggc cag aac ctg gtg	528
cgc gga ctg gcc ctc ttg gcc gag gat ctg gag cgc agc gcc gat cag	576
ctc aac atc cgc ctg acc gac gaa tcc gcc ttc gag ctc ggg cgg gat	624
ctg gcc ctg acc ccg ggc cgg gtg gtg cag cgc acc gag ctc tat gag	672
ctc att cag tac agc ccg act acc gag acg gtg ggc aag aca cct gtg	720
ctg ata gtg ccg ccc ttc atc aac aag tac tac atc atg gac atg cgg	768
ccc cag aac tcc ctg gtc gcc tgg ctg gtc gcc cag ggc cag acg gta	816
ttc atg atc tcc tgg cgc aac ccg ggc gtg gcc cag gcc caa atc gat	864
ctc gac gac tac gtg gtg gat ggc gtc atc gcc gcc ctg gac ggc gtg	912
gag gcg gcc acc ggc gag cgg gag gtg cac ggc atc ggc tac tgc atc	960
ggc ggc acc gcc ctg tcg ctc gcc atg ggc tgg ctg gcg gcg cgg cgc	1008
cag aag cag cgg gtg cgc acc gcc acc ctg ttc act acc ctg ctg gac	1056
ttc tcc cag ccc ggg gag ctt ggc atc ttc atc cac gag ccc atc ata	1104
gcg gcg ctc gag gcg caa aat gag gcc aag ggc atc atg gac ggg cgc	1152
cag ctg gcg gtc tcc ttc agc ctg ctg cgg gag aac agc ctc tac tgg	1200
aac tac tac atc gac agc tac ctc aag ggt cag agc ccg gtg gcc ttc	1248
gat ctg ctg cac tgg aac agc gac agc acc aat gtg gcg ggc aag acc	1296
cac aac agc ctg ctg cgc cgt ctc tac ctg gag aac cag ctg gtg aag	1344
ggg gag ctc aag atc cgc aac acc cgc atc gat ctc ggc aag gtg aag	1392
acc cct gtg ctg ctg gtg tcg gcg gtg gac gat cac atc gcc ctc tgg	1440
cag ggc acc tgg cag ggc atg aag ctg ttt ggc ggg gag cag cgc ttc	1448
ctc ctg gcg gag tcc ggc cac atc gcc ggc atc atc aac ccg ccc gcc	1536
gcc aac aag tac ggc ttc tgg cac aac ggg gcc gag gcc gag agc ccg	1584
gag agc tgg ctg gca ggg gcg acg cac cag ggc ggc tcc tgg tgg ccc	1632
gag atg atg ggc ttt atc cag aac cgt gac gaa ggg tca gag ccc gtc	1680
ccc gcg cgg gtc ccg gag gaa ggg ctg gcc ccc gcc ccc ggc cac tat	1728

gtc aag gtg cgg ctc aac ccc gtg ttt gcc tgc cca aca gag gag gac 1776
 gcc gca tga 1785

<210> 2

<211> 405

<212> DNA

<213> Aeromonas caviae

<220>

<221> CDS

<222> 1..402

<400> 2

atg agc gca caa tcc ctg gaa gta ggc cag aag gcc cgt ctc agc aag 48
 cgg ttc ggg gcg gcg gag gta gcc gcc ttc gcc gcg ctc tcg gag gac 96
 ttc aac ccc ctg cac ctg gac ccg gcc ttc gcc gcc acc acg gcg ttc 144
 gag cgg ccc ata gtc cac ggc atg ctg ctc gcc agc ctc ttc tcc ggg 192
 ctg ctg ggc cag cag ttg ccg ggc aag ggg agc atc tat ctg ggt caa 240
 agc ctc agc ttc aag ctg ccg gtc ttt gtc ggg gac gag gtg acg gcc 288
 gag gtg gag gtg acc gcc ctt cgc gag gac aag ccc atc gcc acc ctg 336
 acc acc cgc atc ttc acc caa ggc ggc gcc ctc gcc gtg acg ggg gaa 384
 gcc gtg gtc aag ctg cct taa 405

<210> 3

<211> 1036

<212> DNA

<213> Yarrowia lipolytica

<220>

<223> promoter ALK3p

<400> 3

ctgcagcggc gagaccgggtt ctggccgac tacgacgtgc	ctggagggac gtcggggag 60
aatctcttg gacgggccaa gatctcccc gaccaccctg ccggacagta	caagtggaa 120
gagggggagt ttcccttgac caagagtgac aagagtgaga acggcaatgg	agtcaatgga 180
gatgagcccg ctactaagaa acaaaaaatc tgaacaagag ccggttttag	tacgatacaa 240
gagccggta c gtggacatgc agctgcttt cgaacatgaa gggagcacga	ccccacgtat 300
caggattatg caagggacca gaagtggcct cgccaaaaga ttggcctcgg	tcaacaaaag 360
gtcatcatat ccgtctccgc atccgtctgt acgtgaatta tgttacttgt	atctttactg 420
tactggtttgc gagctacgtc gccaaactaat gccaaaccagt cctgtggtgt	gtctataggt 480
atgtaataca agtacgagta aatgtattgt actggcgcag cacagtagat	gacggagacg 540
atgaatcggt caccacccac aaacattgcc tccaaacacc gttatattgt	cttactgtcg 600
tggctgagac agactcctcg gggccttgta agagggggaa tgtgtgagac	agatgcccac 660
aagtgaccat gcattttgtg gggcaggaga aaaaccaatg tttgtgggaa	tagaacccat 720
caaataatgaaact ctcccaaataat gaaccactct cttcctccaa tcaaagccct	780
gcgaaatgtc ctccgtctgt ttctcgacc cttagccgta cgacgccata	ttacgatagc 840
ccgccacctt aatgcgttta acttgcattgc atgcgtctgc atacagctgc	atctgtcata 900
tatgcaccat ttccccacac aactgaagtt tatatatata tactgtaagg	actcctgaag 960
tggcacgaac acacacctgatc acagcaacat tacagtacac tactctgctc	gtatittaca 1020
atactggacg aaaatg	1036

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

gctctagact gcagcggcga gaccggttct gg

32

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

ggacacatata cggtccagta ttgtaaaata cgagc

35

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 6

tccccgcggc tgcagcggcg agaccggttc tgg

33

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

ggacacatata gaggccaaacca tcttatggcc c

31

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

cccagatcgcc agatgggt ctgcag

26

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 9

ggacacatata gagcgcacaa tccctggaag t

31

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 10

gggtacctt aaggcagctt gaccacggc

29

<210> 11

<211> 5804

<212> DNA

<213> E.coli, Yarrowia lipolytica

<220>

<223> plasmid pSUT5

<400> 11

aggccattct cgttactgcc aaaacaccac ggtaatcgcc cagacaccat ggacgagttat 60
ctgtctgact cgtcattgcc gcctttggag tacgactcca actatgagtg tgcttggatc 120
actttgacga tacattttc gttggaggct gtgggtctga cagctgcgtt ttcggcgcgg 180
ttggccgaca acaatatcag ctgcaacgtc attgctggct ttcatcatga tcacattttt 240
gtcggcaaag gcgacgccc a gagagccatt gacgttctt ctaatttggaa ccgatagccg 300
tatagtccag tctatctata agttcaacta actcgtaact attaccataa catatacttc 360
actgccccag ataaggttcc gataaaaagt tctgcagact aaatttattt cagtctcctc 420
ttcaccacca aaatgcctc ctacgaagct cgagctaacg tccacaagtc cgcccttgcc 480

gctcgagtgc tcaagcttgtt ggcagccaag aaaaccaacc tgtgtgcttc tctggatgtt 540
 accaccacca aggagctcat tgagcttgc gataaggcgtc gacccatgt gtgcattatgc 600
 aagaccata tcgacatcat tgacgacttc acctacgccc gcactgtgct ccccccaag 660
 gaacttgctc ttaagcacgg ttcttcctg ttcgaggaca gaaagttcgc agatattggc 720
 aacactgtca agcaccagta caagaacggt gtctaccgaa tcgcccagtg gtccgatatc 780
 accaacgccc acggtgttacc cggaaccgga atcattgctg gcctgcgagc tggtgccgag 840
 gaaaactgtct ctgaacagaa gaaggaggac gtctctgact acgagaactc ccagtacaag 900
 gagttcctgg tcccctctcc caacgagaag ctggccagag gtctgctcat gctggccgag 960
 ctgtcttgca agggctctct ggccactggc gagtactcca agcagaccat tgagcttgcc 1020
 cgatccgacc ccgagtttgtt ggttggcttc attgcccaga accgacctaag gggcgactct 1080
 gaggactggc ttattctgac ccccggggtt ggttggctt acaggagggaa cgctctcgga 1140
 cagcagtacc gaactgttga ggatgtcatg tctaccgaa cggatcatatcat aattgtcgcc 1200
 cgaggtctgt acggccagaa ccgagatcct attgaggagg ccaagcgata ccagaaggct 1260
 ggctgggagg cttaccagaa gattaactgt tagaggttag actatggata tgtcattaa 1320
 ctgtgtatat agagagcgtg caagtatggc gcgcgttgc agcttgtatg atggtcagac 1380
 gacctgtctg atcgagttatg tatgatactg cacaacctgt gtatccgcat gatctgtcca 1440
 atggggcatg ttgttgtt tctcgatacg gagatgctgg gtacaagtag ctaatacgat 1500
 tgaactactt atacttatat gaggcttgaa gaaagctgac ttgtgtatga cttattctca 1560
 actacatccc cagtcacaat accaccactg cactaccact acacccaaac catgatcaa 1620
 ccacccatgg acttcctggc ggcagaagaa cttgttatgg aaaagctcaa gagagagaag 1680
 ccaagatact atcaagacat gtgtcgcaac ttcaaggagg accaagctct gtacaccgag 1740
 aaacaggcta gctcgctgt ttcaggaact gttcgatggt tcggagagag tcgcccggca 1800
 gaacatacgc gcaccgatgt cagcagacag cttattaca agtataattca agcaagtata 1860
 tccgtagggt gcgggtgatt tggatctaag gttcgatctc aacactcactc agcagcttgc 1920
 ctatgttaca tcctttatc agacataaca taattggagt ttacttacac acgggggtgt 1980
 cctgtatgag caccacctac aattgttagca ctggatctt tacaaagaat ttattcgtac 2040
 gaatcacagg gacggccgcc ctcaccgaac cagcgaatac ctcagcggtc ccctgcagtg 2100
 actcaacaaa gcgatatacgaa catcttgcga tggatccctg ctgatagttt ttactgtaca 2160
 aacacctgtg tagctcccttc tagcattttt aagttattca cacctcaagg ggagggataa 2220

attaaataaaa ttccaaaagc gaagatcgag aaactaaatt aaaattccaa aaacgaagg 2280
 ggaacacaac cccccgaaaa aaaacaacaa acaaaaaaaaacc caacaaaata aacaaaaaca 2340
 aaataaatat ataactacca gtatctgact aaaagttcaa atactcgta tcacaacaaa 2400
 tagaaatgag ccggccaaaa ttctgcagaa aaaaatttca aacaagtact ggtataatta 2460
 aattaaaaaa cacatcaaag ttcataacg ttagttattt tatTTTattt aataaaagaa 2520
 aacaacaaga tgggctcaaa acttcaact tatacgatac ataccaaata acaatttagt 2580
 atttatctaa gtgctttcg tagataatgg aatacaaatg gatatccaga gtatacacat 2640
 ggatagtata cactgacacg acaattctgt atctctttat gttactact gtgaggcatt 2700
 aaatagagct tgatataat aatgttacat ttcacagtct gaactttgc agattaccta 2760
 atttggtaag atattaatta tgaactgaaa gttgatggca tccctaaatt tgatgaaaga 2820
 tgaaattgtt aatgaggtgg taaaagagct acagtcgtt tttttgaga taccatcatc 2880
 tctaacgaaa tatctattaa aaatctcagt gtgatcatga gtcattgcc tccggaaaa 2940
 tgtcatcatg gctgatattt ctaactgtt acttgagata aatatatatt tacaagaact 3000
 tcccttggaaa ttaatttata tataaaatgt ttggggcaa gttactacga ggaataaatt 3060
 atatctgtt actagaagtt atgaacattc agtataatg cacatataat aaccaacttc 3120
 ggccctttcg tctcgccgt ttgggtatg acggtaaaaa cctctgacac atgcagctcc 3180
 cggagacggt cacagcttgt ctgttaagcgg atgccggag cagacaagcc cgtcagggcg 3240
 cgtcagcggg tttggcggg tgcgggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattt 3300
 tactgagagt gcaccatacg cgctatag ggcattttgg agctccaccg cggggcggc 3360
 cgctctagaa ctagtgatc cccgggctg caggaattcg atatcaagct tatcgatacc 3420
 tgcaccccg agggggggccc cggtaaccag ctttgcctt tgcgcctat ggggtgtgaa 3480
 ataccgcaca gatgcgttaag gagaaaatac cgcattcaggc gctgcattaa tgaatcgccc 3540
 aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattt ggcgttcc ctaggcaatt aacagatagt 3600
 ttggccgtga taattctt aacccac actccttgcataacgatt tatgtaacga 3660
 aactgaaatt tgaccagata ttgtttaaa tagaaaatct ggctttagg tggcaaaatc 3720
 ccgtcttgc tcatcaattc cctctgtac tactcgat ccctttatgt tcgactgtcg 3780
 tatttcttata tttccatata tatgcgttgc agatgcccgt gtcctccctcg ctcactgact 3840
 cgctgcgcgc ggtcggtcgg ctgcggcggc cggatcaggc tcactcaaag gcggtataatac 3900
 ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 3960

aggccagggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgaaaa ccataggctc cgccccctg 4020
acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccggaca ggactataaa 4080
gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgc tcctgttccg accctgccgc 4140
ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgaaaagcgt ggcgccttct caatgctcac 4200
gctgttaggtt tctcagttcg gtgttaggtcg ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac 4260
cccccggtca gcccggaccgc tgccgccttat ccggtaacta tcgtcttgc tccaacccgg 4320
taagacacga ctatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt 4380
atgttaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 4440
cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cgaaaaaaga gttggtagct 4500
cttgatccgg caaacaaacc accgctggta gcgggttttt ttttgggc aagcagcaga 4560
ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcccttgc ttttctacg gggctgacg 4620
ctcagtgaa cggaaactca cgttaaggga ttttggcat gagattatca aaaaggatct 4680
tcacctagat cttttaaat taaaaatgaa gttttaatc aatctaaagt atatatgagt 4740
aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtggc acctatctca gcgatctgtc 4800
tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcggtta gataactacg atacggagg 4860
gcttaccatc tggcccgagt gctgcaatga taccggcaga cccacgtca cccggctccag 4920
atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt 4980
tatccgcctc catccagtct attaattttt gcccggaaagc tagagtaagt agttcgccag 5040
ttaatagttt ggcacgtt gttggcattt ctacaggcat cgtgggtca cgctcgctgt 5100
tttgtatggc ttcattcagc tccgggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca 5160
tgttgtcaa aaaagcggtt agtccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg 5220
ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat 5280
ccgtaagatg ctttctgtg actggtagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgt 5340
tgcggcgacc gagttgctct tgcccggtt caatacggga taataccggc ccacatagca 5400
gaactttaaa agtgctcatc attggaaaaac gttttcgaaa gcgaaaaactc tcaaggatct 5460
taccgctgtt gagatccagt tcgatgttttccactcggtc acccaactga ttttcagcat 5520
cttttactttt caccagcggtt tctgggttagt caaaaacagg aaggcaaaat gcccggaaaa 5580
agggaaataag ggcgacacgg aatgtttagt tactcataact cttcctttt caatattatt 5640
gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa 5700

ataaaacaaat aggggttccg cgcacattc cccgaaaagt gccaccgtac gtctaagaaa 5760
ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgat cacg 5804

<210> 12

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker DNA

<400> 12

tactcttagag

10

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例においてベクターとして使用したプラスミド pSUT5を示す模式図である。

【図2】

実施例において構築したプラスミド pSUT-phaJを示す模式図である。

【図3】

実施例において構築したプラスミド pSUT-PHA1を示す模式図である。

【図4】

実施例において構築したプラスミド pSUT-PHA2を示す模式図である。

【図5】

本発明の形質転換体を作製する際に用いられるプラスミドの構築方法を示したプラスミド構築図である。

【図6】

実施例において製造されたポリエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した結果である。

【図7】

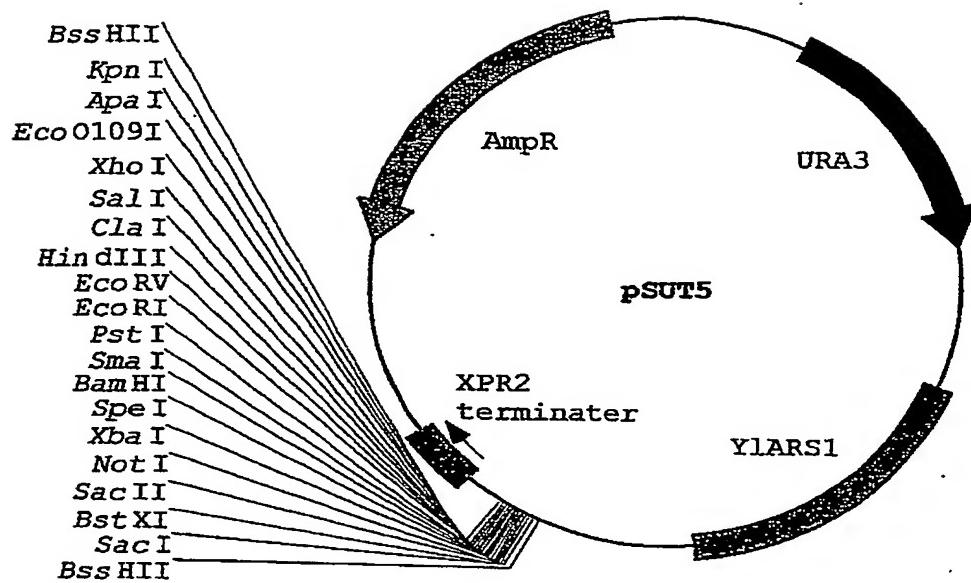
実施例において製造されたポリエステルのNMR分析のチャートである。

【図8】

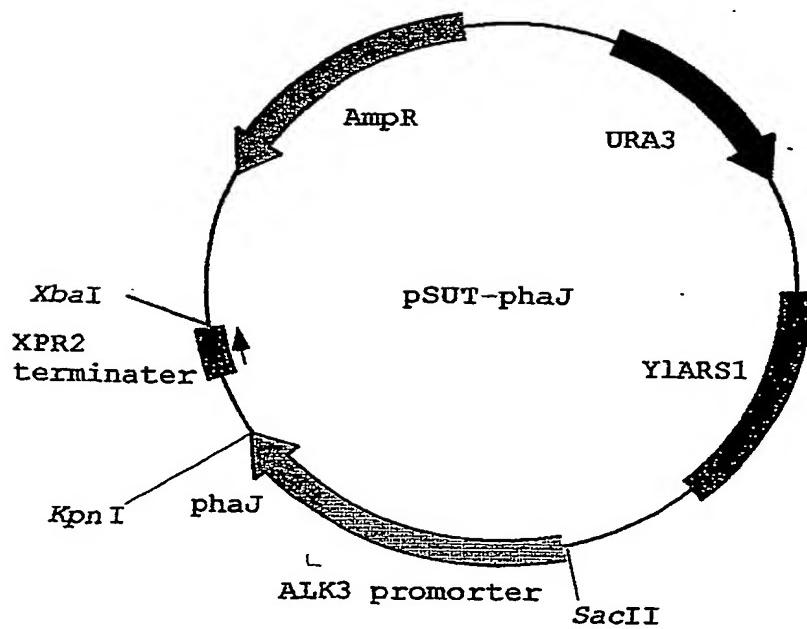
実施例において製造されたポリエステルのIR分析のチャートである。

【書類名】 図面

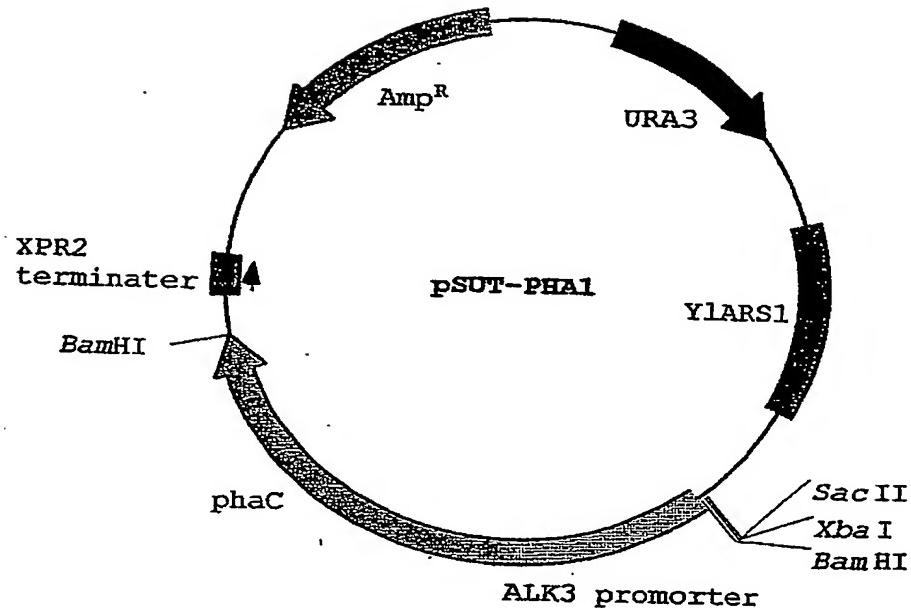
【図1】



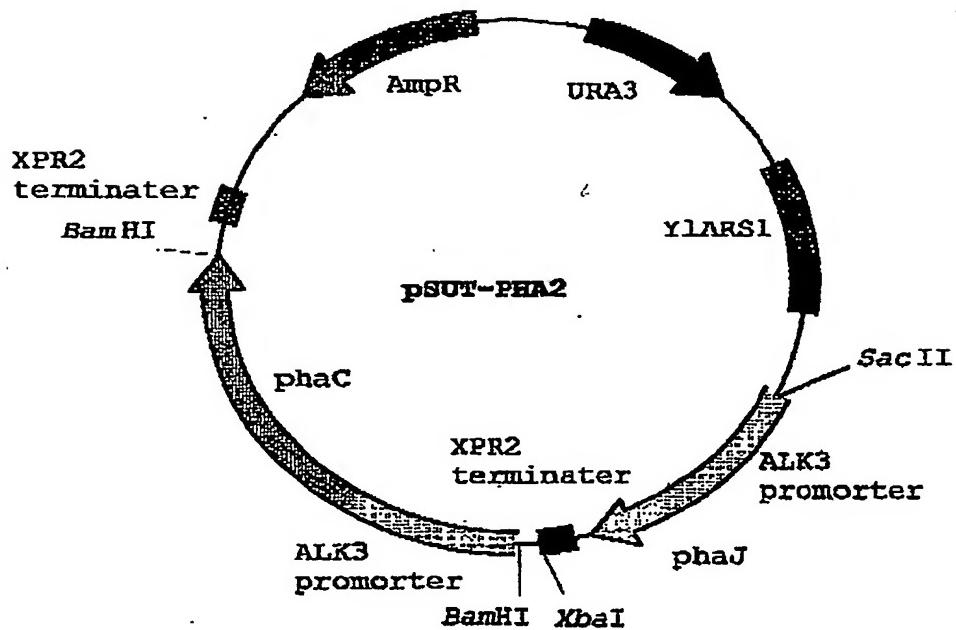
【図2】



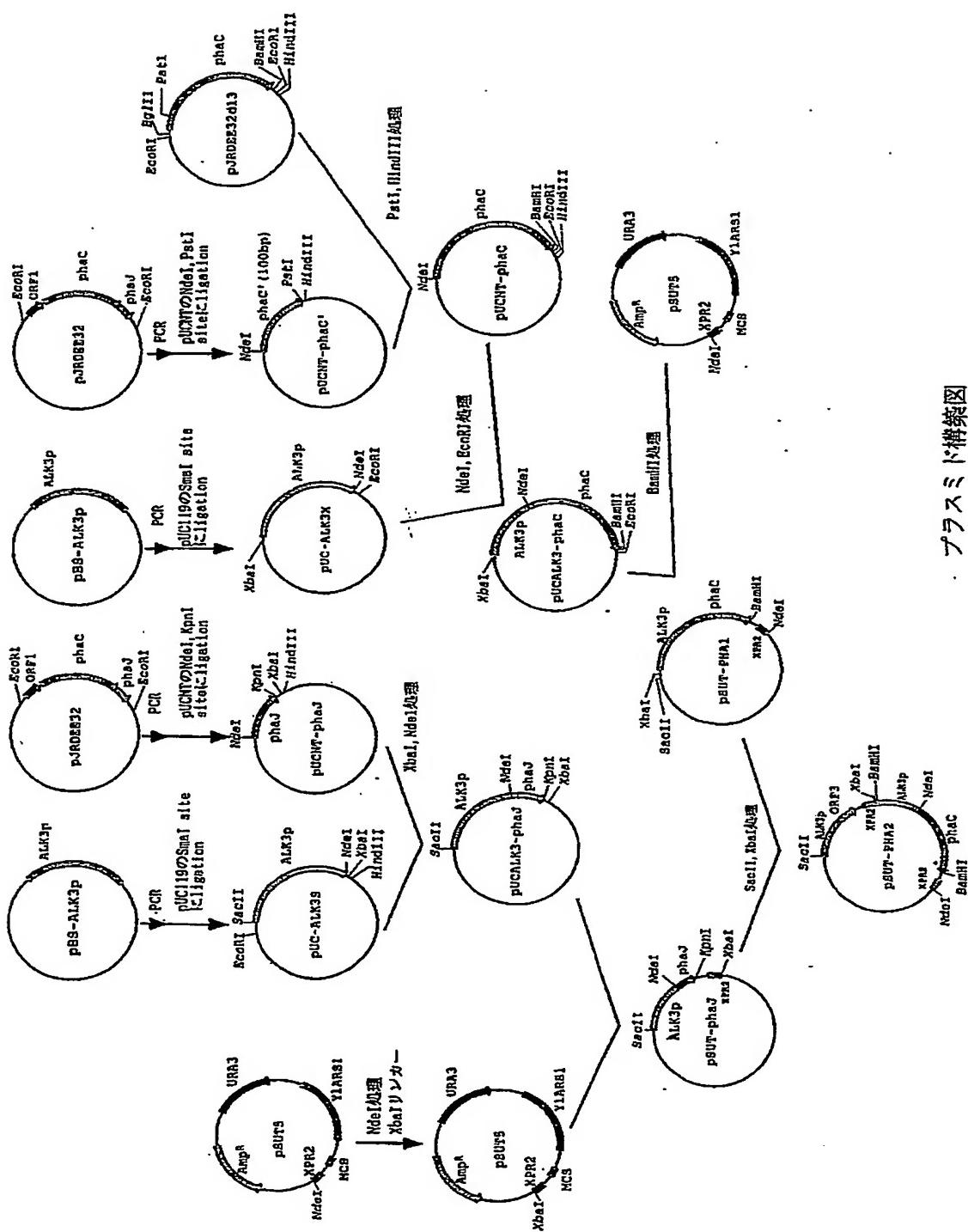
【図3】



【図4】



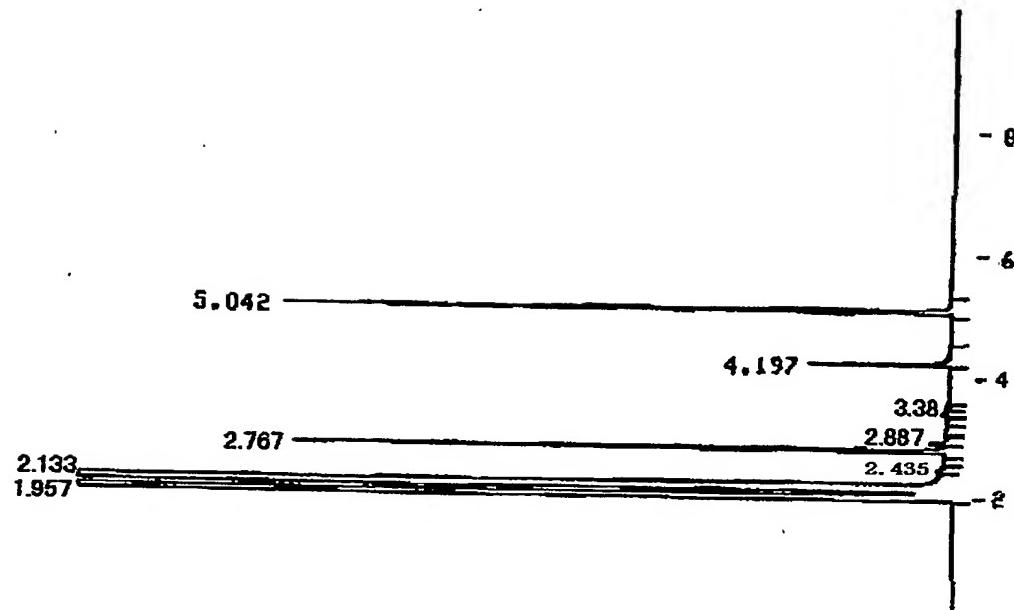
【図5】



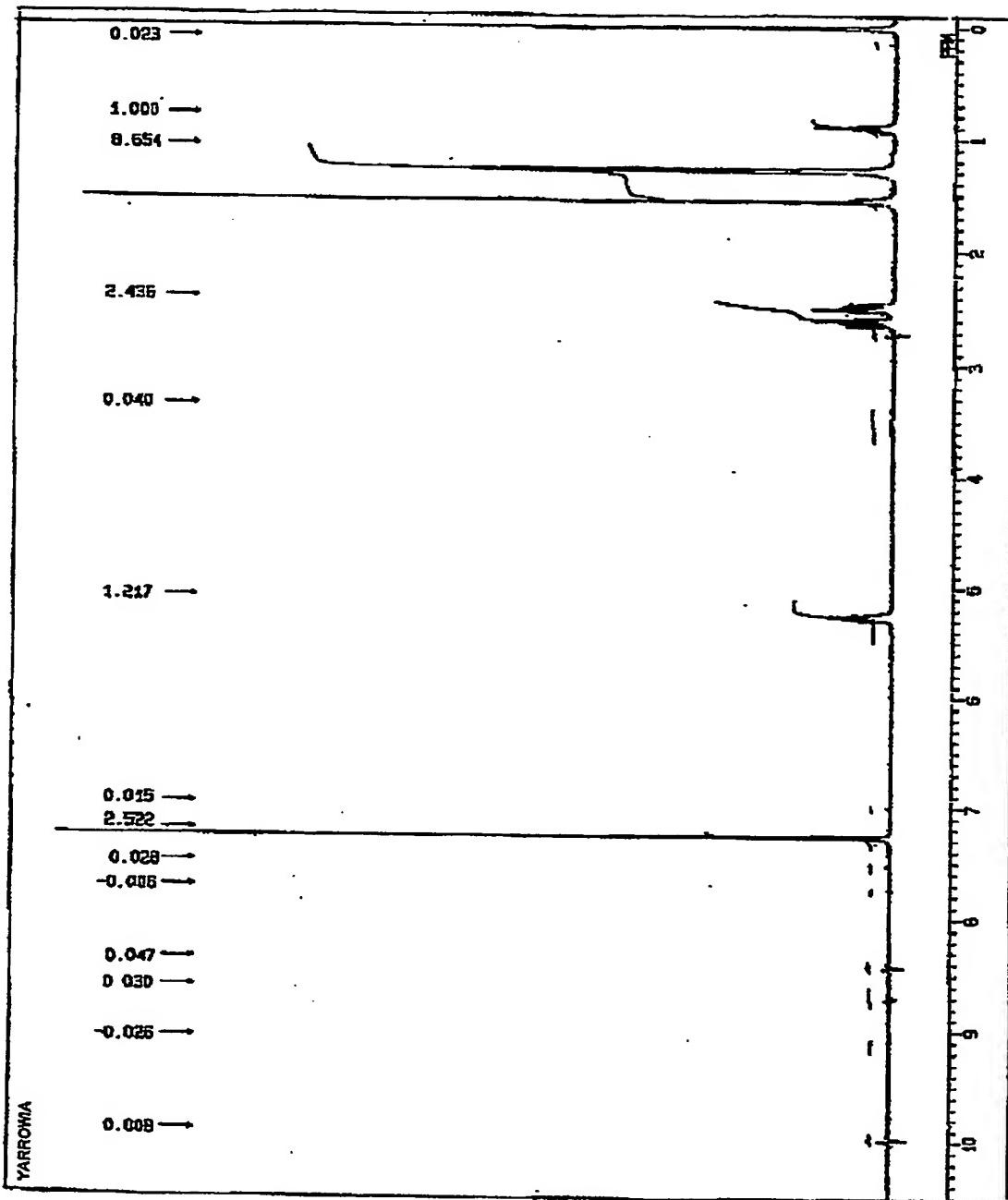
プラスミド構築図

特2000-148726

【図6】



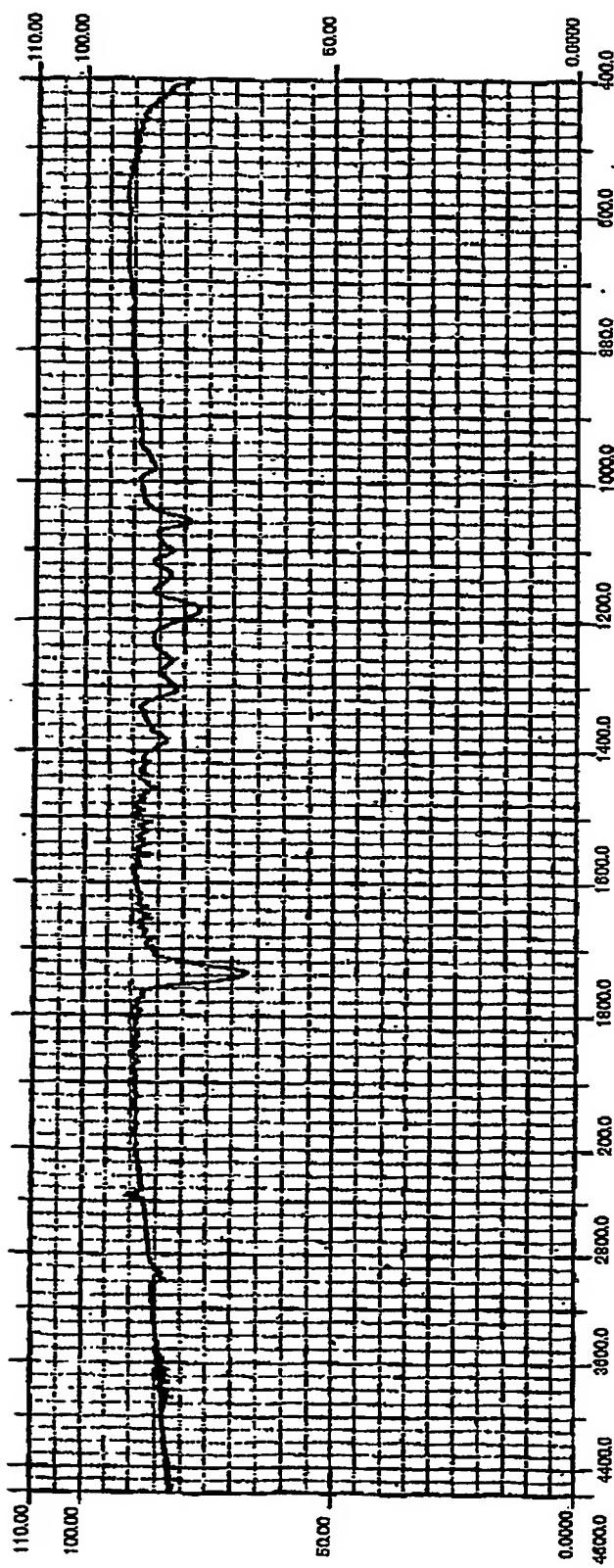
【図7】



YARROWIA

特2000-148726

【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ポリエステル合成に関する遺伝子発現カセットを酵母に導入して形質転換した形質転換体、及び、得られた形質転換体を培養することにより、生分解性かつ優れた物性を有するP(3HB-co-3HH)等のポリエステルを酵母を宿主として製造する方法を提供する。

【解決手段】 酵母に、ポリエステルの合成に関する酵素遺伝子発現カセットが一種以上導入されてなる形質転換体。

【選択図】 なし

特2000-148726

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-148726
受付番号	50000622169
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成12年 5月22日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成12年 5月19日

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
氏 名 鐘淵化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.